

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年1 月30 日 (30.01.2003)

PCT

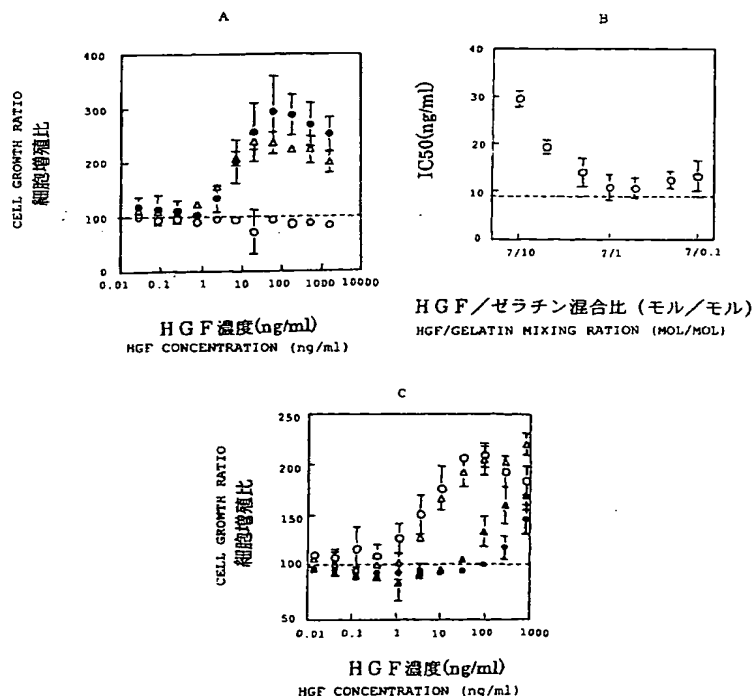
(10) 国際公開番号
WO 03/007982 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 38/22, 9/06, 9/08, 47/42, 47/48, A61P 9/00, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/07155
- (22) 国際出願日: 2002 年7 月15 日 (15.07.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-218870 2001 年7 月18 日 (18.07.2001) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒611-0024 京都府 宇治市 琵琶台 3-8-1 6 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒541-0044 大阪府 大阪市 中央区伏見町四丁目 2 番 1 4 号 藤村 大和生命ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: SUSTAINED RELEASE HGF HYDROGEL PREPARATIONS

(54) 発明の名称: HGF ヒドロゲル徐放性製剤



(57) Abstract: Sustained release HGF gelatin hydrogel preparations comprising a hydrogel and hepatocyte growth factor (HGF), wherein the hydrogel is obtained by crosslinking a gelatin (1) being an acidic gelatin obtained by alkali-hydrolysis of collagen, (2) having a molecular weight of

[続葉有]



WO 03/007982 A1



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

from about 100,000 to about 200,000 Da determined by SDS-PAGE under non-reductive conditions, (3) having an isoelectric point of about 5, and (4) having a zeta potential in an aqueous solution of from about -15 to about -20 mV; and angiogenesis promoters or remedies for arterial diseases with the use of the preparations.

(57) 要約:

本発明は、(1)コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンであって、(2)分子量がSDS-PAGEの非還元条件下で約10万～約20万ダルトンであって、(3)等電点が約5であって、(4)水溶液中のジータ電位が約-15～約-20 mVであるゼラチンを架橋して得られるヒドロゲルと肝実質細胞増殖因子(HGF)からなるHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤および該製剤を利用した血管新生促進剤又は動脈疾患治療剤に関する。

明細書

HGFヒドロゲル徐放性製剤

技術分野

本発明は、肝実質細胞増殖因子（HGF）と特定の物性を有するゼラチンヒドロゲルとの組み合わせにより得られるHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤に関する。さらに詳しくは、本発明は、HGFとゼラチンヒドロゲルとの複合体、HGF含浸ゼラチンヒドロゲル製剤もしくはこれらを利用した血管新生促進剤、または動脈疾患治療剤などに関する。

背景技術

肝実質細胞増殖因子（HGF）は成熟肝細胞に対する強力な増殖促進因子として発見され、その遺伝子クローニングがなされたタンパク質である（Biochem Biophys Res Commun, 122, 1450 (1984)、Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 83, 6489, (1986)、FEBS Letter, 22, 311 (1987)、Nature, 342, 440 (1989)、Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 87, 3200 (1990)）。その後の研究により、HGFは *in vivo* において肝再生因子として障害肝の修復再生に働くだけでなく、血管新生作用を有し、虚血性疾患や動脈疾患の治療または予防に大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた（Symp. Soc. Exp. Biol., 47 cell behavior, 227-234 (1993), Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 1937-1941 (1993), Circulation, 97, 381-390 (1998)）。

このようにHGFは血管新生因子の機能を始めとして種々の機能を持っており、医薬品として活用するため色々な試みがなされてきた。しかし、ここで問題となってきたのがHGFの血中での半減期である。HGFの半減期は数分から10分と短く、血中濃度を維持することが困難であり、また、患部へのHGFの有効量の移行が問題となった。このように、タンパク質を溶液の形で注射するだけでは注射部位から急速に拡散排泄されることから、必ずしもHGFの十分な生理活性を期待することは難しいと考えられた。

しかし、*in vivo* の有効性を高める唯一考えられる方法は、ポリマー担体に

HGF を含浸させ、長時間にわたるHGFの徐放を可能にすることである。近年、塩基性線維芽細胞増殖因子、骨誘導タンパク質および形質転換成長因子などいくつかの増殖因子が、種々の担体マトリックスと併用した場合に in vivo で予測した生理活性を示すことがいくつかの試験で示された[Downs, E. C. ら 1992 年、
5 Miyamoto, S. ら 1992 年、Gombotz, W. R. ら 1993 年]。しかし、in vivo でのHGFの放出に関する報告は全くない。生理的に過剰な用量でHGF溶液を注射すると、予測した生理作用を誘導するという研究結果がいくつかあるのみである[Matsuda, Y. ら 1995 年]。

すでに本発明者は、bFGF、TGF- β 1およびHGFは、細胞外マトリックス (ECM) のヘパラン硫酸またはヘパリンなどの酸性多糖類と相互作用して体内に蓄えられる[Taipale, J., Keski-Oja, J. 1997 年、Mizuno, K. ら 1994 年、Arakaki, N. ら 1992 年、Sakata, H. ら 1997 年]との知見に基づき、これら増殖因子の徐放のために種々の検討を試みてきた。これまで、「塩基性」bFGFおよびTGF- β 1の場合には、イオンの相互作用できる等電点 5.0 の
10 「酸性」ゼラチンから生分解性ヒドロゲルを調製し、これにbFGFおよびTGF- β 1を含浸させたヒドロゲルを作製した。これらの含浸ヒドロゲルは、生体内での分解によって生理活性の増殖因子を徐放することができ、放出された増殖因子は in vivo の生理作用を示し、活性を保つ時間が増殖因子放出時間によく対応した[Tabata, Y., Ikada, Y. 1999 年]。

20 しかしながら、HGFに関しては、どのようなゼラチンヒドロゲルが好適な組み合わせであるのかが明確でなく、HGFについて具体的なゼラチンヒドロゲル製剤の作製が望まれている状況であった。

本発明は、HGFの徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤を提供することを目的とする。さらに詳しくは、本発明は、HGFとゼラチンあるいはゼラチンヒドロゲルとの複合体もしくはこれらを利用した血管新生促進剤、または動脈疾患治療剤な
25 どに関する。

本発明者は、HGFの徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤について、鋭意検討を行

った。すなわちまず、HGFとゼラチンヒドロゲルとの徐放効果について検討を行い、ある特定の物性を持ったゼラチンヒドロゲルとHGFの組み合わせにおいてのみ、顕著な徐放性効果を示すことを明らかにした。

また、HGFとゼラチンヒドロゲルとの間である特定のモル比（HGF：ヒドロゲルを構成するゼラチンが約7：1のモル比）で複合体を形成することが明らかとなった。さらに、同様にHGFとゼラチンとの間でも複合体が形成され、複合体中のHGFはトリプシン等のタンパク質分解酵素にも安定であることが分かった。

このHGFゼラチン（ヒドロゲル）複合体は、溶液中のイオン強度の影響が少ないことから、静電相互作用だけでなく、疎水結合等の他の作用も大きく寄与している複合体であることが明らかとなった。例えば、HGF以外のタンパク質であるbFGFの場合、同様にbFGFゼラチンヒドロゲル複合体を形成するが、この複合体はイオン強度の影響を大きく受け、溶液中のイオン強度の増大と共にゼラチンに対するbFGFの収着が抑制される。しかし、HGFの場合にはbFGFに比べてイオン強度の影響が少ないものとなっている。

また、本発明に適切なゼラチンを用いてグルタルアルデヒドの量を変えた化学的架橋性ゼラチンを作製し、種々の分解性の異なるヒドロゲルを調製し、その効果を検討した。例えば、 ^{125}I 標識HGF含浸ゼラチンヒドロゲルを作製してマウスの体内に埋植すると、グルタルアルデヒド濃度が高くなるにしたがって、HGF放射能がマウス皮下組織に長く残存することが明らかとなった。このように各ゼラチンヒドロゲルに残存するHGFの時間プロファイルは、ヒドロゲル分解の時間プロファイルによく一致しており、これはヒドロゲル生分解によるHGF放出を示すものであることが明らかとなった。

さらに、本発明に好適なゼラチンゲルを用いて、HGF含浸ゼラチンヒドロゲルを作製し、マウスに埋植すると、埋植したヒドロゲル周辺に血管新生による組織学的変化が誘導された。即ち、HGFとして5および10 μg を含浸したゼラチンヒドロゲル製剤を埋植することによって、埋植部位周囲に新たに形成される

毛細管の数が有意に増大することを見出した。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

発明の開示

即ち本発明の要旨は以下のとおりである。

- 5 1. 以下の物性を有するゼラチンを架橋して得られるゼラチンヒドロゲルと肝実質細胞増殖因子 (HGF) からなるHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤:
 - (1) コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンである、
 - (2) 分子量がSDS-PAGEの非還元条件下で約10万～約20万ダルトンで
 - 10 ある、
 - (3) 等電点が約5である、
 - (4) 水溶液中のジータ電位が約-15～約-20mVである。
2. ゼラチンヒドロゲルの含水率が約80～99w/w%である上記1記載のHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤。
- 15 3. ゼラチンヒドロゲルを構成するゼラチン1モルに対してHGFが約7モル以下の比で含有される上記1または2記載のHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤。
4. HGFと以下の物性を有するゼラチンからなる、HGF安定化ゼラチン製剤:
 - (1) コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンで
 - 20 ある、
 - (2) 分子量がSDS-PAGEの非還元条件下で約10万～約20万ダルトンである、
 - (3) 等電点が約5である、
 - (4) 水溶液中のジータ電位が約-15～約-20mVである。
- 25 5. 以下の物性を有するゼラチンに対してHGFが約5倍量以下の重量比で形成されるHGFゼラチン複合体:
 - (1) コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンで

ある、

(2) 分子量が SDS-PAGE の非還元条件下で約 10 万～約 20 万ダルトンである、

(3) 等電点が約 5 である、

5 (4) 水溶液中のジータ電位が約 -15 ～約 -20 mV である。

6. 上記 5 記載の HGFゼラチン複合体を含有してなる HGF 安定化ゼラチン水溶液製剤。

7. 上記 1～3 のいずれかに記載の HGF 徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤、上記 4 記載の HGF 安定化ゼラチン製剤、上記 5 記載の HGFゼラチン複合体および

10 上記 6 記載の HGFゼラチン安定化水溶液製剤からなる群より選択されるいずれかの製剤からなる血管新生促進剤。

8. 上記 1～3 のいずれかに記載の HGF 徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤、上記 4 記載の HGF 安定化ゼラチン製剤、上記 5 記載の HGFゼラチン複合体および上記 6 記載の HGFゼラチン安定化水溶液製剤からなる群より選択されるいずれ

15 かの製剤からなる動脈疾患治療剤。

図面の簡単な説明

図 1 は、 125 I 標識ヒドロゲルのゲル 1 (○)、ゲル 2 (●) およびゲル 3 (△) をマウスの背に皮下埋植した後の残存放射能の時間経過を示す。この線は最小 2 乗法による。

20 図 2 は、 125 I 標識 HGF を含浸するゲル 1 (○)、ゲル 2 (●) およびゲル 3 (△) をマウスの背に皮下埋植した後、あるいはマウスの背に溶液の形で 125 I 標識 HGF を皮下注射 (▲) した後の残存放射能の時間経過を示す。この線は最小 2 乗法による。

25 図 3 は、マウスの背に皮下埋植した後の 125 I 標識 HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルと 125 I 標識ゼラチンヒドロゲルとの残存放射能の関係を示す。ヒドロゲルはゲル 1 (○)、ゲル 2 (●) およびゲル 3 (△) から調製した。

図 4 は、HGF を含まない PBS (A) および遊離 HGF $10 \mu\text{g}$ (B) の注

射後、またはHGFを含浸せず、他に何も含まないゲル2ヒドロゲル (C) およびHGF 1 μ g (D)、5 μ g (E) および10 μ g (F) 含浸ゲル2ヒドロゲルを埋植後、7日目の各マウスの皮下組織性状を示す。

図5は、HGFを含まないPBS (A) および遊離HGF 10 μ g (B) の注射後、またはHGFを含まず、他に何も含まないゲル2ヒドロゲル (C) およびHGF 1 μ g (D)、5 μ g (E) および10 μ g (F) 含浸ゲル2ヒドロゲルを埋植後、7日目の各マウスの組織学的切片を示す。矢印は新たに形成された血管を示す。

図6は、ゼラチンとの複合体形成によるHGFのトリプシンに対する安定化効果を示すゲル電気泳動の結果である。レーン1、9、10は標準タンパク質、レーン2はゼラチン (新田ゼラチン; 等電点9.0)、レーン3はHGF+ゼラチン (新田ゼラチン; 等電点9.0)、レーン4は37°C、24時間インキュベーション後のHGF+ゼラチン (新田ゼラチン; 等電点9.0)、レーン5はHGF単独、レーン6は37°C、24時間インキュベーション後のHGF+ゼラチン (新田ゼラチン; 等電点5.0)、レーン7はHGF+ゼラチン (新田ゼラチン; 等電点5.0)、レーン8はゼラチン (新田ゼラチン; 等電点5.0)、レーン11はゼラチン (シグマ社, タイプA)、レーン12はゼラチン (和光純薬社製)、レーン13はゼラチン (新田ゼラチン; 等電点9.0)、レーン14はゼラチン (新田ゼラチン; 等電点5.0) である。

図7 (A、BおよびC) は、HGFの細胞増殖促進活性に及ぼすゼラチンとの混合の影響を示す。図7Aは、遊離HGF (●)、ゼラチン (○)、酸性ゼラチンと混合したHGF (△) の細胞増殖活性のHGF濃度との関係を示す。図7Bは、ゼラチンと混合したHGFの細胞増殖促進活性に与えるHGF/ゼラチンの混合比の影響を示す。図7Cは、トリプシンで処理した (●) もしくは処理していないHGF (○) およびトリプシンで処理した (▲) もしくは処理していないHGF+ゼラチン (△) における細胞増殖率とHGF濃度との関係を示す。

発明の詳細な説明

本発明で使用するゼラチンとは、以下の物性を有するゼラチンであり、市販のゼラチンとは異なるものである。

(1) コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンである、

5 (2) 分子量が SDS-PAGE の非還元条件下で約 10 万～約 20 万ダルトンである、

(3) 等電点が約 5 である、

(4) 水溶液中のジータ電位が約 $-15 \sim -20$ mV である。

市販のゼラチンとして、例えば、シグマ社製タイプ A ゼラチン、和光社製ゼラチンがあるが、水溶液中のジータ電位が以下のように異なっている。

シグマ社製タイプ A ゼラチン： 約 $0 \sim 5$ mV

和光社製ゼラチン： 約 $-5 \sim -2$ mV

ジータ電位は物質（ゼラチン）の静電的な荷電の程度を表す尺度であり、本発明における HGF と静電的複合体を形成するゼラチンの指標としては好適なものと考えられる。

本発明のゼラチンは牛を始めとする各種の動物種の皮膚・腱などの部分あるいはコラーゲンからアルカリ加水分解して得られるものである。好ましくは、ウシの骨由来の I 型コラーゲンをアルカリ処理して調製した酸性ゼラチンであり、新田ゼラチン社の試料 IEP5.0 として入手することもできる。なお、酸処理して調製した塩基性ゼラチンは同じく新田ゼラチン社の試料 IEP9.0 として入手することができるが、ジータ電位は以下のように大きく相違する。

酸性ゼラチン（新田ゼラチン社試料 IEP5.0）： 約 $-15 \sim -20$ mV

塩基性ゼラチン（新田ゼラチン社試料 IEP9.0）： 約 $+12 \sim +15$ mV

本発明で使用するゼラチンヒドロゲルとは、上記ゼラチンを用いて種々の化学的架橋剤と縮合させて得られるヒドロゲルのことである。化学的架橋剤としては、例えばグルタルアルデヒド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチ

ル) カルボジイミド—メト—p—トルエンスルホナート等の水溶性カルボジイミド、ビスエポキシ化合物、ホルマリン等が好ましく、グルタルアルデヒド、および1—エチル—3—(3—ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩が特に好ましい。

- 5 また、ゼラチンは熱処理又は紫外線照射によっても架橋化できる。

ゼラチンヒドロゲルの形状は特に制限はないが、例えば、円柱状、角柱状、シート状、ディスク状、球状、粒子状などがある。円柱状、角柱状、シート状、ディスク状のものは、通常移植片として用いられることが多く、また、球状、粒子状のものは注射投与も可能である。

- 10 円柱状、角柱状、シート状、ディスク状のゼラチンヒドロゲルは、ゼラチン水溶液に架橋剤水溶液を添加するか、あるいは架橋剤水溶液にゼラチンを添加し、所望の形状の鑄型に流し込んで、架橋反応させることにより調製することができる。また、成形したゼラチンゲルにそのまま、あるいは乾燥後に架橋剤水溶液を添加してもよい。架橋反応を停止させるには、エタノールアミン、グリシン等の
- 15 アミノ基を有する低分子物質に接触させるか、あるいはpH 2.5以下の水溶液を添加する。得られたゼラチンヒドロゲルは、蒸留水、エタノール、2—プロパノール、アセトン等により洗浄し、製剤調製に供される。

- 球状、粒子状のゼラチンヒドロゲルは、例えば、三口丸底フラスコに固定した攪拌用モーター（例えば、新東科学社製、スリーワンモーター、EYELA miniD.C. Stirrer 等）とテフロン（登録商標）製攪拌用プロペラを取り付け、フラスコと
- 20 一緒に固定した装置にゼラチン溶液を入れ、ここにオリーブ油等の油を加えて200～600rpm程度の速度で攪拌し、W/O型エマルジョンとし、これに架橋剤水溶液を添加するか、ゼラチン水溶液を予めオリーブ油中にて前乳化（例えば、ボルテックスミキサー Advatec TME-21、ホモジナイザー polytron PT10-
- 25 35 等を用いて）しておいたものをオリーブ油中に滴下し、微粒子化したW/O型エマルジョンを調製し、これに架橋剤水溶液を添加して架橋反応させ、遠心分離によりゼラチンヒドロゲルを回収した後、アセトン、酢酸エチル等で洗浄し、

さらに2-プロパノール、エタノール等に浸漬して架橋反応を停止させることにより、調製することができる。得られたゼラチンヒドロゲル粒子は、2-プロパノール、Tween 80を含む蒸留水、蒸留水等で順次洗浄し、製剤調製に供される。

- 5 ゼラチンヒドロゲル粒子が凝集する場合には、例えば超音波処理（冷却下、1分以内程度が好ましい）等を行ってもよい。

尚、前乳化することによって、粒子サイズが20 μm 以下の微粒子状のゼラチンヒドロゲルを得ることができる。

- 10 得られるゼラチンヒドロゲル粒子の平均粒径（通常の方法で、水で膨潤した粒子の顕微鏡写真から最低400個以上の粒子の粒子径を測定して平均を算出することにより得られる値）は1～1000 μm であり、目的に応じて適宜必要なサイズの粒子をふるい分けて使用すればよい。

球状、粒子状のゼラチンヒドロゲルを調製する別法として以下の方法も挙げられる。

- 15 上記の方法と同様の装置にオリーブ油を入れ、200～600 rpm程度の速度で攪拌し、ここにゼラチン水溶液を滴下してW/O型エマルジョンを調製し、これを冷却後、アセトン、酢酸エチル等を加えて攪拌し、遠心分離によりゼラチン粒子を回収する。回収したゼラチン粒子を、さらにアセトン、酢酸エチル等、次いで2-プロパノール、エタノール等で洗浄後、乾燥させる。この乾燥ゼラチン粒子を0.1% Tween 80を含む架橋剤水溶液に懸濁させ、緩やかに攪拌しながら架橋反応させ、使用した架橋剤に応じて0.1% Tween 80を含む100 mMグリシン水溶液又は0.1% Tween 80を含む0.004 N HCl等にて洗浄し、架橋反応を停止することによりゼラチンヒドロゲル粒子を調製することができる。本法で得られるゼラチンヒドロゲル粒子の平均粒径は上記の方法の場合と同様である。
- 20
- 25

架橋反応条件は特に制限はないが、例えば、0～40℃、1～48時間で行うことができる。

本発明のゼラチンヒドロゲルは、その含水率がHGFの徐放性に大きく影響することが明らかとなっており、好ましい徐放性効果を示す含水率としては約80～99w/w%が挙げられる。さらに好ましいものとしては、約95～98w/w%のものが挙げられる。

- 5 本発明のゼラチンヒドロゲルは適宜、適当な大きさに切断後凍結乾燥し滅菌して使用することができる。凍結乾燥は、例えば、ゼラチンヒドロゲルを蒸留水に入れ、液体窒素中で30分以上、又は-80℃で1時間以上凍結させた後に、凍結乾燥機で1～3日間乾燥させることにより行うことができる。

ゼラチンヒドロゲルを調製する際のゼラチンと架橋剤の濃度は、所望の含水率
10 に応じて適宜選択すればよいが、ゼラチン濃度は1～20w/w%、架橋剤濃度は0.001～1w/w%が挙げられる。

なお、市販のゼラチンとして例えば、シグマ社製タイプAゼラチン、和光社製ゼラチンを用いてゼラチンヒドロゲルを作製した場合には、HGFを含浸させたヒドロゲルを用いても、HGFの徐放効果を得ることができなかった。このよう
15 に、上記の本発明の酸性ゼラチンを使用し、上記のゼラチンヒドロゲルを調製した場合に、HGFの徐放効果を得ることができた。

本発明で使用されるHGFは公知物質であり、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば、種々の方法で調製されたものを用いることができ、また既に市販されている製品（例えば、東洋紡 Code No. HGF-101 等）を使用しても
20 よい。HGFの製造法としては、例えば、HGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養上清等から分離、精製して該HGFを得ることができる。あるいは遺伝子工学的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFを得ることができる（例えば Nature, 342, 440
25 (1989)、特開平 5-111383 号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 967 (1989) など参照）。上記の宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、酵母又は動物細胞な

どを用いることができる。このようにして得られたHGFは、天然型HGFと実質的に同じ作用を有する限り、そのアミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されていてもよく、また同様に糖鎖が置換、欠失及び／又は付加されていてもよい。

- 5 本発明におけるHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤とは、上記の酸性ゼラチンヒドロゲルにHGFを含浸させて得られる製剤である。また、本発明のHGF安定化ゼラチン製剤は、HGFと上記の酸性ゼラチンからなる製剤である。HGFは塩基性タンパク質であるため、溶液中で酸性ゼラチン（ヒドロゲル）と複合体を形成するが、前述の溶液中のイオン強度変化に対するHGFの収着抑制効果を考慮すると、このHGFゼラチン（ヒドロゲル）複合体は静電的相互作用だけでなく、疎水結合等の他の相互作用が大きく寄与している。この複合体の解離定数（Kd）およびゼラチンに対するHGFの結合モル比はスキャッチャード結合モデル[Scatchard, G. 1949 年]にしたがって得られた。ゼラチンに対するHGFの結合モル比として、およそHGF分子7個が酸性ゼラチン分子1個に結合していることが示された。なお、同様の複合体を形成するbFGFの場合と比較すると、bFGFゼラチン複合体は1：1のモル比であり、HGFとは大きく相違している。
- 10
- 15

- また、37℃の酸性ゼラチンのKd値は $5.5 \times 10^{-7} \text{M}$ で、これは20℃の硫酸ヘパリンのKd値 $1 \times 10^{-9} \sim 2.0 \times 10^{-10} \text{M}$ よりも約2～3次数大きい[Rahmoune Hら 1998 年]。これはHGFゼラチン複合体の結合性がHGFヘパリン硫酸ほど強固でなく、緩やかであることを示している。
- 20

- ゼラチンに対してHGFのモル比を約1：7以上に上げた場合には、HGFの遊離が起きやすく活性的にはほとんど遊離のHGFと同様の挙動を示す。しかし、HGFのモル比を約1：7以下に下げた場合には、HGFが吸着され解離するものが少なくなるため、HGFの見かけの活性は低下するように見える。
- 25

従って、HGFとゼラチンあるいはゼラチンヒドロゲルとの複合体として、HGFとゼラチンのモル比が種々の変化したものが作り得るが、初期バーストを回

避するためには、好適なものとして、ゼラチン（またはゼラチンヒドロゲルを構成するゼラチン）1モルに対してHGFが約7モル以下のモル比の複合体が挙げられる。

5 なお、ゼラチンに対しては、HGFの重量比が約5倍量以下のものが好適である。さらに好適なものとしては、ゼラチンに対してHGFが約5～約 $1/10^4$ 倍量の重量比のものが望ましい。

10 本発明のHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤は、HGFの徐放性効果とHGFの安定化効果を持つため、HGFの機能を少量で長時間にわたって発揮し得る。そのため、HGFの本来的機能である血管新生の作用を効果的に発揮するので、
10 本発明のHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤は、哺乳動物（例えば、ネコ、ウシ、イヌ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトなど）の血管新生促進剤、あるいは動脈疾患（例えば、動脈硬化症、虚血再灌流障害、心筋梗塞、狭心症、難治性動脈疾患、バージャー病、移植後動脈硬化症等）の治療剤として有効に使用できる。

15 本発明のHGF安定化ゼラチン製剤は、ゼラチンヒドロゲル製剤と同様にHGFゼラチンの静電的複合体に基づくゼラチンのHGF保護効果を有しており、トリプシン等のタンパク質分解酵素に対しても安定に存在する。この安定化効果に基づき、また水溶液として利用しやすい等の点から、注射用製剤として、非経口的に使用することができる。例えば、皮下、筋肉内、静脈内、体腔内あるいは障害臓器等に投与することができる。したがって、本発明のHGF安定化ゼラチン
20 製剤は、哺乳動物（例えば、ネコ、ウシ、イヌ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトなど）の血管新生促進剤、動脈疾患治療剤、臓器障害治療剤として有効に使用できる。

25 水溶液の形態であるHGF安定化ゼラチン製剤（HGF安定化ゼラチン水溶液製剤）は、注射用水、各種緩衝液（例えば、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、HEPES緩衝液、Tris緩衝液等）中に上記HGFゼラチン複合体（好ましくはゼラチンに対してHGFの重量比が約5倍量以下のもの）を含有するものである。
当該製剤中のHGFゼラチン複合体の濃度は特に制限されず、治療目的の疾患、患者の年齢、体重、投与量等に応じて適宜調整することができる。例えば、成人

患者に対して当該製剤を約 1 ～ 約 10 ml 投与する場合、当該製剤中の HGFゼラチン複合体の濃度は、HGF の濃度として、通常約 0.001 ～ 約 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲、好ましくは約 0.1 ～ 約 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲とすることができる。

- 5 本発明の HGF 徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤あるいは複合体は、それぞれの用途に応じて適宜剤型を工夫することができる。例えば、シート状、スティック状、粒子状、ロッド状、ペースト状の剤型にして投与することができる。

投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、体腔内投与などが考えられる。

- 10 本発明の製剤は、必要に応じて製剤上許容し得る一般的な添加剤（安定化剤、保存剤、可溶化剤、pH調整剤、増粘剤等）を含めることができる。これらは公知のものが使用できる。さらに、徐放効果を調節する各種添加剤（アミノ酸、アミノ基あるいはリン酸基、硫酸基、SH基、カルボキシル基などを持つ糖、脂質などの低分子物質あるいは高分子物質など）やHGFの効果を高める作用やHGF
- 15 Fの分解・失活を抑制する作用などを有する他の活性成分も含ませることができる。このような他の活性成分としては、当該作用を有する限り特に制限されず、多糖、脂質、糖脂質、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、薬物として利用できる各種低分子化合物または高分子化合物などのいかなる低分子物質あるいは高分子物質でもよい。

- 20 本発明の製剤の投与量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、HGFとして、通常成人患者当たり約 0.01 ～ 約 500 μg の範囲、好ましくは約 1 ～ 約 200 μg の範囲から投与量が選択され、これを患部またはその周辺部位に注入することができる。また 1 回の投与で効果が不十分であった場合は、該投与を複数回行うことも可能である。

- 25 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実施例 1

HGF 含浸ゼラチンヒドロゲル製剤の調製

(1)ゼラチンヒドロゲルの調製

ウシの骨由来の I 型コラーゲンをアルカリ処理して調製して得られたゼラチン（新田ゼラチン社製試料 IEP 5.0）を用いて、5wt%のゼラチン水溶液 50 ml を調製し、グルタルアルデヒド水溶液（25 wt%）40, 50 および 70 μ l と混合し、それぞれ最終濃度が 5.00, 6.25 および 8.75mM とした。混合溶液をプラスチック製の型（8×8 cm²、6 mm 厚）に注ぎ、ゼラチンを架橋させるために 4℃で 18 時間放置した。その後、得られたゼラチンヒドロゲルシートを 100 mM グリシン水溶液に 37℃で 1 時間浸し、グルタルアルデヒドのアルデヒド残基をブロックした。架橋性ヒドロゲルシートを約 10 mg のディスク（直径 6mm）に切断した後、このヒドロゲルディスクを 37℃の再蒸留水（DDW）で 3 回洗浄し、凍結乾燥した。表 1 にゼラチンヒドロゲルの調製条件およびその含水量をまとめた。DDW 中で 37℃、24 時間膨潤させた前後のヒドロゲル重量を計測し、湿ったヒドロゲルに対するヒドロゲル中の水の重量比である含水量を計算した。グルタルアルデヒド濃度が高いほど、このヒドロゲル含水量は減少した。凍結乾燥したヒドロゲルをエチレンオキシドガスによって滅菌した。凍結乾燥および滅菌過程の前後でヒドロゲルの形状に変化はなかった。

表 1 調製したゼラチンヒドロゲルの特徴

コード	ゼラチン濃度 (wt%)	グルタルアルデヒド濃度 (mM)	含水量 (wt%)
ゲル 1	5	8.75	93.8
ゲル 2	5	6.25	94.8
ゲル 3	5	5.00	96.0

(2)HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルの調製

HGF（PeproTech EC. Ltd. 製、London UK）の 1、5 および 10 μ g を含むリン

- 酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.4) を用いて、凍結乾燥したディスク状のゼラチンヒドロゲルに HGF を含浸させた。HGF を含浸せず、他に何も含まないヒドロゲルの調製は、HGF を含まない PBS を用いたことを除けば、同じ方法であった。簡潔に記載すると、HGF を含む PBS または HGF を含まない PBS 20 μ l を凍結乾燥
- 5 したゼラチンヒドロゲル上に滴下し、4°Cで一晩放置すると、ヒドロゲルの種類には関係なく、HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルを得た。この溶液量が理論的に各ヒドロゲルに含浸される量よりもかなり少なかったために、膨潤工程で凍結乾燥したゼラチンヒドロゲルに HGF 水溶液を完全に収着した。同じく、 125 I 標識 HGF の水溶液を凍結乾燥したゼラチンヒドロゲルディスクに収着し、 125 I 標識 HGF 含浸
- 10 ゼラチンヒドロゲルを調製した。 125 I 標識 HGF の調製はこれまでに報告されているクロラミン T 法にしたがって行った[Lyon, M. ら 1994 年]。調製したそれぞれのヒドロゲルディスクは、ヒドロゲルの種類および放射性標識に関係なく、外観(形状および大きさ)は同じであった。

実施例 2

15 HGF 安定化ゼラチン製剤の調製

(1)HGF とゼラチンの複合体 (約 7:1 のモル比) の調製

実施例 1 記載のゼラチンを使用し、74 μ g/ml 溶液を調製した。HGF (Genzyme/Techne 社製) の 14.7 μ g/ml 溶液を調製し、5 μ l を分取し、5 μ l のゼラチン水溶液に添加攪拌後、37°C、24 時間静置し作製した。

20 (2)約 7:1 のモル比以外の HGF とゼラチンの静電複合体の調製

前項のゼラチン水溶液と HGF 水溶液とを異なる比率で混合し所望のモル比となるように調製し、37°C、24 時間静置し作製した。

参考例 1

ゼラチンの物性測定

25 (1)等電点測定

酸性ゼラチン (新田ゼラチン社試料 IEP5.0) の 1w/w%水溶液を調製し、この水溶液を陽イオンカラム、陰イオンカラムで濾過処理し、濾取された水溶液の

pH を測定する。測定値として、pH 約 4.9~5.0 の値が得られた。この値をゼラチンの等電点として表す。

(2) ジータ電位測定

ゼラチンをミリキュー処理の水に溶解し、0.1mg/ml 水溶液を調製した。この
5 水溶液を ELS (ELS-7000AS、大塚電子社製) を用いて測定した。測定温度は 25
~27℃であり、ELS 標準セルを用いて行った。

その結果を以下に示す。

[ゼラチン試料]

[ジータ電位]

酸性ゼラチン (新田ゼラチン社試料 IEP5.0)	: 約-15 ~ 約-20 mV
10 塩基性ゼラチン (新田ゼラチン社試料 IEP9.0)	: 約+12 ~ 約+15 mV
シグマ社製タイプAゼラチン	: 約0 ~ 約5 mV
和光社製ゼラチン	: 約-5 ~ 約-2 mV

参考例 2

ゼラチンヒドロゲルの in vivo 分解プロフィール

15 (1) ゼラチンヒドロゲルの放射性標識

¹²⁵I-Bolton-Hunter 試薬を用いて、実施例 1 記載のゼラチンヒドロゲルを放射性ヨウ素標識した[Bolton, A.E., Hunter, W.M. 1963 年]。ベンゼンが完全に蒸発するまで、乾燥窒素ガスを ¹²⁵I-Bolton-Hunter 試薬の無水ベンゼン溶液 100μl に吹き付け、ベンゼンを蒸発させた。次に、0.1M ホウ酸ナトリウム緩衝
20 液 125μl (pH 8.5) をこの乾燥試薬に加え、¹²⁵I-Bolton-Hunter 試薬の水溶液を調製した。ディスクひとつにつき 20μl の調製済み水溶液を凍結乾燥したディスク状のゼラチンヒドロゲルに含浸させた。この結果膨潤したヒドロゲルを 4℃で 3 時間維持し、¹²⁵I 残基をゼラチンのアミノ基に導入した。4℃で 4 日間定期的に DDW を交換することによって、結合していない遊離した ¹²⁵I 標識試薬を
25 ¹²⁵I 標識ゼラチンヒドロゲルから除いた。定期的に測定すると、DDW の放射能は 3 日間洗浄した後、バックグラウンド値に戻った。ヒドロゲル調製条件に関わらず、放射性標識およびその後の洗浄工程中に、膨潤ヒドロゲルディスクの形状変

化は観察されなかった。最終的に得られた膨潤ヒドロゲルを凍結乾燥した。

(2)ゼラチンヒドロゲルの in vivo 分解の評価

体内埋植した ^{125}I 標識ゼラチンヒドロゲルの放射能の減衰からゼラチンヒドロゲルの in vivo 分解を評価した。ddY マウスの背の皮下組織に種々の ^{125}I 標識ゼラチンヒドロゲルを体内埋植した (3 匹/群、6~7 週齢、Shizuoka Animal Center、静岡県)。ヒドロゲル埋植の 1, 3, 5, 7, 10, 14 および 21 日目に、ガンマ計数器 (ARC-301B、アロカ、東京都) を用いて、埋植ヒドロゲルの放射能を計測した。次に、マウスの背のヒドロゲル埋植部位周囲の皮膚を、 $3 \times 5 \text{ cm}^2$ の小片に切除し、この筋膜部位を濾紙で徹底的に拭き取り、溶出した ^{125}I 標識ゼラチンを吸収した。皮膚小片および濾紙の放射能を測定し、埋植ヒドロゲル周囲組織の残存放射線を評価した。最初に埋植したヒドロゲルの放射能に対する総放射線量の比は、ヒドロゲル分解のために残存する活性比率を示すものであった。それぞれの実験群には 21 匹のマウスを用い、特に記載がない限り、in vivo 評価のための各評価時に 3 匹ずつ屠殺した。すべての動物実験は、動物実験に関する京都大学の学内ガイダンスにしたがって行った。

この結果を図 1 に示す。図 1 には、 ^{125}I 標識ゼラチンヒドロゲルをマウスの背に皮下埋植した後に残存するゼラチン放射能の時間経過を示す。ヒドロゲル調製に用いるグルタルアルデヒド濃度が高くなるにつれて、放射能が長期間残存するが、すべてのヒドロゲルで残存放射能は時間とともに減衰した。たとえば、最も含水率の高いゼラチンヒドロゲルは体内埋植後 7 日以内に分解されたが、最も含水率が低いヒドロゲルは 21 日にわたり体内に維持された。

以上のように、グルタルアルデヒド濃度が高くなるにしたがって、ゼラチンヒドロゲルが遅く分解された。一般に、ヒドロゲル調製に用いられるグルタルアルデヒド濃度が高くなれば、それだけヒドロゲルの架橋程度が高くなる。このため、ヒドロゲルの架橋程度は立体化学的にゼラチン鎖に対するプロテアーゼの加水分解アプローチを小さくし、その結果、タンパク質加水分解に対する感受性が小さくなると思われる。

実施例 3

HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルからの in vivo HGF 放出の評価

¹²⁵I 標識 HGF を含浸する種々のゼラチンヒドロゲルをマウスの背の皮下組織に埋植した。¹²⁵I 標識 HGF (100 μ l/部位) の水溶液をマウスの背部皮下に注射した。異なる時間間隔で埋植ヒドロゲルまたは注射部位を含むマウスの皮膚を取り出し、上記と同じ方法で濾紙を用いてその筋膜部位を徹底的に拭き取った。残りのゼラチンヒドロゲル、皮膚小片および濾紙の放射能をガンマ計数器で測定し、使用前の HGF に対するこの放射線の比率を in vivo HGF 放出のために残存する活性比率として示した。

- 10 この結果を図 2 に示す。図 2 には、¹²⁵I 標識 HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルをマウスの背に皮下埋植した後の HGF 放射能の減衰パターンを示す。HGF の残存放射能は経時的に漸減し、ヒドロゲルの種類には関係なかった。放射能の減衰パターンはヒドロゲルの種類に大きく依存した。架橋性ヒドロゲルのグルタルアルデヒド濃度が高くなるにしたがって、放射能が長く維持された。その一方、¹²⁵I 標識した遊離 HGF の注射後の放射能は、注射部位から 1 日以内に消失した。

図 3 には、ヒドロゲルの残存放射能の相関的要素として、HGF の放射能残存量を示す。ヒドロゲルの種類に関わりなく、ふたつの残存放射能間に良好な相関が認められ、傾きは約 1 であった。

- 20 以上のように、図 1 と図 2 を比較すると、HGF 放射能は分解が早いヒドロゲルで急速に減衰した。HGF ヒドロゲル放射能間の減衰パターンに良好な相関が認められる (図 3) ということは、ヒドロゲルの生分解にともない体内のゼラチンヒドロゲルから HGF が放出されたことを意味する。吸着実験では HGF が酸性ゼラチンに相互作用することを示している。いったん酸性ゼラチンと相互作用すると、ヒドロゲル分解によって水溶性ゼラチン断片が生成されない限り、ヒドロゲルから HGF 分子を放出できなくなると考えられる。

実施例 4

ゼラチンヒドロゲルに収着した HGF の定量

ヒドロゲルに対する HGF 吸着の等温式を作製するため、種々の量の ^{125}I 標識 HGF を含む水溶液 (0.5 ml) を、DDW 1 ml にあらかじめ膨潤しておいたヒドロゲルに添加した。37°C で 48 時間かけて HGF 吸着が進み、HGF 濃度に関係なく、平衡化した HGF 吸着にはこれで十分であることがわかった。放射線を測定することによって、溶液中の遊離 HGF の平衡濃度 (C_f) を算定した。HGF およびゼラチンのモル重量を 90,000 および 100,000 として、ゼラチンに吸着した HGF のモル比 (r) を計算した。スキヤッチャード結合モデル [Scatchard, G. 1949 年] にしたがって、 r/C_f をプロットした。 $r/C_f - r$ 直線で $r = 0$ のときの傾きおよび切片から、解離定数 (K_d) およびゼラチンに対する HGF の結合モル比を得た。

10 このゼラチンへの HGF 吸着に対する結果を以下に示す。

ゼラチンヒドロゲルに対する HGF の吸着等温式は、ラングミュアの吸着等温式とした (データ示さず) ために、吸着パラメータはスキヤッチャード解析法に基づいて計算した。37°C の酸性ゼラチンの K_d 値は $5.5 \times 10^{-7} \text{M}$ で、これは 20°C の硫酸ヘパリンの K_d 値 $1 \times 10^{-9} \sim 2.0 \times 10^{-10} \text{M}$ よりも約 2~3 次数大きい [Rahmoune H ら 1998 年]。これはゼラチンに対する HGF の親和性がきわめて低いことを示している。およそ HGF 分子 7 個が酸性ゼラチン分子 1 個に結合した。

実施例 5

HGF の *in vitro* バイオアッセイ

Mv1Lu 細胞の *in vitro* 増殖を促す HGF またはゼラチンと複合体形成した HGF の作用に関して、その生理活性を評価した [Tajima, H. ら 1992 年]。培養培地にはイーグル培地 (10%ウシ胎児血清 (FCS) およびペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO カタログ番号 15140-122) を含有する Nissui) を用いた。まず、培養培地 100 μl を 96 ウェルマルチウェル培養プレート (Corning Corster) に入れ、5%CO₂-95%空気雰囲気下、37°C で 1 時間インキュベートした。次に、HGF 水溶液 50 μl または HGF 濃度 1.25 $\mu\text{g/ml}$ で調製した HGF-ゼラチン複合体をウェルに加え、各 HGF 試料を含む培地 50 μl (150 μl) を順次隣のウェルに移していき、3 倍段階希釈によって、11 のウェルを調製した。ゼラチンと HGF の混合物

を DDW 中で 37℃にした。簡潔に記載すると、HGF/ゼラチン混合比率を 14.2/1 および 7.1/1 として、種々の濃度の水溶液を 1 および 12 時間放置し、種々の HGF-ゼラチン複合体を調製した。各 HGF 試料のために、HGF 濃度ごとに 3 つのウェルを用いた。最後に、細胞懸濁液 100 μ l (1×10^4 細胞/ml) を各ウェルに播種した。72 時間インキュベーションした後、細胞数計測キット-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Bethesda, MD, USA) を用いて、細胞増殖を検定した。各ウェルにキット-8 溶液 (10 μ l) を添加し、この細胞を 37℃で 4 時間インキュベートした。UV max Kinetic Plate Reader (Molecular Devices Co., Menlo Park, CA, USA) を用いて、450 nm の波長で各ウェルの収着度を測定した。試料ウェルの収着度を後者に対する HGF を含まない対照の収着度と比較した (%細胞増殖)。各 HGF 試料に対して最大細胞増殖の 50%を誘導できる HGF 濃度を GC₅₀ と表現した。

この結果を表 2 に示す。表 2 には、HGF および HGF-ゼラチン複合体の GC₅₀ 値をまとめた。GC₅₀ 値の範囲は HGF/ゼラチン混合比および混合時間にほとんど依存しないものの、GC₅₀ 値はゼラチン複合体形成によって増加する。37℃でゼラチンと複合体形成すると、HGF の用量-反応曲線が高用量の向きに、もとの HGF の用量-反応曲線に平行になるようにシフトする。ゼラチン自体は細胞増殖を促進するような作用を持たない (データ示さず)。

表 2 HGF および酸性ゼラチンと混合した HGF の生理活性

	HGF/ゼラチン混合比 (モル/モル)	混合時間 (時間)	GC ₅₀ (ng/ml)
HGF 単独	-	-	15.35
混合 HGF	7.1	1	117.9
		12	178.0
	14.2	1	122.8
		12	103.7

以上のように、表 2 には酸性ゼラチンと複合体形成した場合でも、HGF が生理活性を示すことを示した。HGF の活性が小さくなることはゼラチンの複合体形成から説明することができる。HGF はゼラチンと複合体形成するため、細胞表面受容体への HGF の作用は遊離の HGF よりも小さいと考えられる。

5 実施例 6

HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルによって誘導される血管新生の in vivo 評価

HGF 1、5 および 10 μ g を含浸するゼラチンヒドロゲル、HGF を含浸せず、何も含まないゼラチンヒドロゲルのいずれかをマウスの背の皮下組織に体内埋植した。対照として、HGF 10 μ g を含む PBS または含まない PBS をマウスの背に皮下注射した。各実験群は実験ポイントにつき 6 匹であった。体内埋植または注射から 7 日後にマウスを屠殺し、背の皮下組織にみられる HGF 誘導性血管新生作用を評価した。HGF の血管新生は組織の性状、組織学的検査および生化学的検査をもとに評価した。まず、HGF の埋植部位または注射部位周囲の皮下組織の写真撮影し、肉眼的所見で血管新生作用を評価した。次に、6 匹のマウスから 3 匹を無作為選択し、埋植ヒドロゲルまたは注射部位を含む皮膚標本を 10 wt% 中和ホルムアルデヒド溶液で固定し、パラフィンに包埋して、切片 (5 μ m 厚) を作製した。作製した切片をヘマトキシリン-エオジン染色し、光学顕微鏡で組織学的に観察した。各実験群につき 3 匹のマウスから得た 3 つの組織学的切片を用いて、HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルまたは HGF を含まないゼラチンヒドロゲルの埋植部位のほか、HGF および PBS の注射部位の周囲に新たに形成された毛細管の数を評価した。簡潔に記載すると、埋植部位または注射部位 (3 ヶ所/切片) 周囲の固定領域を無作為に観察し、毛細管の数を数えた。

残りの 3 匹は HGF 誘導性血管新生の生化学的検査に用いた。ヒドロゲル埋植部位または注射部位周囲の皮膚小片 (2×2 cm²) を鋏で小さく切断し、0.1M トリス-HCl および 0.2mM EDTA 溶液 1ml で 4℃、24 時間処理することでタンパク質成分を抽出した。遠心分離 (12000rpm、10 分、4℃) した後、得られた上清の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の濃度を ELISA 法で明らかにした。

HGF によって活性化された細胞が VEGF を分泌し、この VEGF が HGF の血管新生作用に介在することが報告されている[Wojta, J. ら、1999 年]。

この結果を図 4 と表 3 に示す。図 4 は、異なる用量の HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルの埋植または HGF を含む PBS 溶液の注射後の背側の皮膚の組織性状を示したものである。血管新生による変化が HGF 5 および 10 μ g を含浸するゼラチンヒドロゲルの埋植部位周囲に認められ、高用量であっても遊離 HGF の注射部位とはまったく対照的であるように思われた。溶液の形での HGF 注射は、皮下組織の血管分布にまったく影響せず、注射部位の組織所見は HGF を含まない PBS 注射マウスの所見に類似していた。HGF を含まないゼラチンヒドロゲル単独では血管新生による変化は誘導されなかった。図 5 にはこの組織切片を示す。HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルを埋植した場合、新たな血管が埋植部位周囲に形成され、HGF の用量が増すにつれて、その範囲が大きくなった。HGF を含浸しないゼラチンヒドロゲルも最高用量の遊離 HGF もいずれも無効であった。HGF を含浸する埋植ヒドロゲルまたは HGF を含浸しない埋植ヒドロゲルに対する有害反応および重篤な炎症反応は、観察されなかった。

表 3 HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルの埋植部位

または遊離 HGF の注射部位周囲で新たに形成された毛細管の数

	毛細管の数 (mm^{-2})
HGF 含浸ゼラチンヒドロゲル	
(HGF 10 μ g/マウス)	7.9 \pm 2.9* [†]
(HGF 5 μ g/マウス)	8.3 \pm 3.8* [†]
(HGF 1 μ g/マウス)	4.5 \pm 1.9
遊離 HGF	
(HGF 10 μ g/マウス)	1.5 \pm 0.6
HGF を含まず、他に何も含まないゼラチンヒドロゲル	4.4 \pm 1.8
PBS	2.6 \pm 1.1

* $p < 0.05$; 遊離 HGF 投与群に対する有意性

20 [†] $p < 0.05$; empty ゼラチンヒドロゲル埋植群に対する有意性

表 3 は、HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルの埋植部位周囲に新たに形成された毛細管の数を示す。この毛細管の数は、ほかの実験群に比して、HGF 5 および 10 μ g を含浸するゼラチンヒドロゲルによって有意に上昇した。遊離 HGF 10 μ g では血管新生を誘導せず、毛細管の数は HGF を含まない PBS および何も含まないゼラチンヒドロゲルと同じであった。

表 4 HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルの埋植後

または遊離 HGF の注射後 7 日目のマウス皮下組織での VEGF 誘導濃度

	VEGF (μ モル/部位)
HGF 含浸ゼラチンヒドロゲル	
(HGF 10 μ g/マウス)	1.59 \pm 0.89
(HGF 5 μ g/マウス)	2.18 \pm 0.33
(HGF 1 μ g/マウス)	N. D.
遊離 HGF	
(HGF 10 μ g/マウス)	N. D.
HGF を含まず、他に何も含まないゼラチンヒドロゲル	N. D.
PBS	N. D.

N. D. : 検出されず

表 4 には、HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルの埋植後および遊離 HGF の注射後、マウスの皮下組織にみる VEGF 濃度を示す。注射から 7 日目、PBS 溶液中の HGF 10 μ g が注射部位の VEGF を誘導せず、HGF を含まない PBS 注射または未治療の正常マウスとほぼ同じであった。しかし、HGF 5 および 10 μ g を含浸するゼラチンヒドロゲルによって、埋植後 7 日でヒドロゲル周囲の VEGF 濃度が上昇し、何も含まれていないゼラチンヒドロゲルとは対照的であった。

以上のように、表 3 から、HGF 含浸ゼラチンヒドロゲルが同量の遊離 HGF よりも著明な範囲で血管新生を誘導することが明らかである。HGF によって活性化された細胞が VEGF を分泌し、この VEGF が HGF の血管新生作用に介在すると報告されている [Wojta J. ら 1999 年]。HGF 5 および 10 μ g を含浸するゼラチンヒドロゲルの埋植から 7 日後でも、VEGF 誘導が観察された (表 4)。1 μ g の量は

長時間にわたり、誘導性 VEGF 濃度を維持するほど十分な用量ではなかった。総合すると本データは、in vivo 環境に曝露されていても、ゼラチンヒドロゲルに含浸される HGF がその生理活性を維持することを示している。分解によってヒドロゲルから放出された HGF が in vivo 血管新生を誘導すると考えられる。

5 実施例 7

HGFゼラチン製剤のトリプシンに対する安定性

実施例 2 記載の HGFゼラチン製剤にトリプシン水溶液 ($2.3 \mu\text{g/ml}$) を $5 \mu\text{l}$ 加え、よく攪拌した後、 37°C 、3 時間静置した。さらにトリプシンインヒビター水溶液 ($3.5 \mu\text{g/ml}$) を $5 \mu\text{l}$ 加え、よく攪拌した後、 37°C 、1 時間静置した。これを 10%アクリルアミドゲルによる SDS-PAGE を行った (20mA、90 分)。コントロールとして、ゼラチン水溶液のみ、HGF 水溶液のみ、トリプシンおよびトリプシンインヒビターを加えなかったもの、HGF 溶液にトリプシンおよびトリプシンインヒビターを加えたものを共に電気泳動した。その結果を図 6 に示す。本発明の HGFゼラチン製剤は、トリプシン処理によっても HGF はほとんど分解されなかった (レーン 4 および 6)。

実施例 8

HGFゼラチン製剤の生物活性

実施例 2 記載の HGFゼラチン製剤を用いて、ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液に加えた。その混合溶液中で $Mv1Lu$ 細胞 (ミンク肺上皮細胞株) を培養した。コントロールとして、HGF 水溶液、ゼラチン水溶液を使用した。

HGF 濃度の異なる培養液中で、3 日間培養した後の増殖細胞数をセル・カウティング・キット (同仁化学研究所製) により計測し、HGF の無添加培養時の増殖細胞数に対する百分率として細胞増殖率を算出した。細胞増殖率を HGF 濃度に対してプロットした場合の、最大細胞増殖率の $1/2$ となる HGF 濃度を $IC_{50}(\text{ng/ml})$ とした。この値あるいは細胞増殖率から HGF の生物活性を評価した。ゼラチンと混合した HGF あるいは HGF をトリプシンを用いて酵素消化した。その後、同様にして HGF の細胞増殖率を評価することによって、ゼラチン

との混合によるHGFの酵素消化抵抗性を調べた。なお、データはすべてDunnettの多重比較法によって解析し、 $P < 0.05$ で統計的有意性を認めた。実験結果は平均±平均の標準偏差(SD)で表した。結果を図7に示す。

図7Aは、遊離HGF、ゼラチン、酸性ゼラチンと混合したHGFの細胞増殖
5 活性を示す。ゼラチンとの混合の有無に関係なく、HGF濃度の増加とともに細胞増殖効率は増加したが、その程度はゼラチンと混合することにより若干低下した。ゼラチン自身には細胞増殖の促進作用は見られなかった。図7Bは、ゼラチンと混合したHGFの細胞増殖促進活性に与えるHGF/ゼラチンの混合比の影響である。混合比が7/1以下では、HGFの細胞増殖促進活性が低下した。こ
10 れは、ゼラチンとの相互作用により、HGFの細胞表面レセプターへの親和性が低下したことが原因であると考えられる。図7Cは、トリプシン処理がHGFの細胞増殖促進活性に与える影響を示す。ゼラチンと混合することによってHGFのトリプシン消化抵抗性の向上が認められた。HGFがゼラチンによりカバーされ、HGF分子がトリプシンにより攻撃されにくくなったためであると考えられ
15 る。

産業上の利用可能性

本発明により、HGFのゼラチン徐放性製剤が提供でき、さらには、この製剤を用いて血管新生促進剤または動脈疾患治療剤などが提供される。本発明の血管新生促進剤または動脈疾患治療剤は、多くの患者に適用可能であり、さらに、H
20 GFの有効な治療製剤としての有用性が期待される。

本出願は、日本で出願された特願2001-218870号を基礎としており、その内容は本明細書中に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. 以下の物性を有するゼラチンを架橋して得られるゼラチンヒドロゲルと肝実質細胞増殖因子（HGF）からなるHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤：

(1) コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンである、

(2) 分子量がSDS-PAGEの非還元条件下で約10万～約20万ダルトンである、

(3) 等電点が約5である、

(4) 水溶液中のジータ電位が約-15～約-20mVである。

2. ゼラチンヒドロゲルの含水率が約80～99w/w%である請求項1記載のHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤。

3. ゼラチンヒドロゲルを構成するゼラチン1モルに対してHGFが約7モル以下の比で含有される請求項1または2記載のHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤。

4. HGFと以下の物性を有するゼラチンからなる、HGF安定化ゼラチン製剤：

(1) コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンである、

(2) 分子量がSDS-PAGEの非還元条件下で約10万～約20万ダルトンである、

(3) 等電点が約5である、

(4) 水溶液中のジータ電位が約-15～約-20mVである。

5. 以下の物性を有するゼラチンに対してHGFが約5倍量以下の重量比で形成されるHGFゼラチン複合体：

(1) コラーゲンからのアルカリ加水分解処理によって得られる、酸性ゼラチンである、

(2) 分子量がSDS-PAGEの非還元条件下で約10万～約20万ダルトンで

ある、

(3)等電点が約5である、

(4)水溶液中のジータ電位が約 -15 ～約 -20 mVである。

6. 請求項5記載のHGFゼラチン複合体を含有してなるHGF安定化ゼラチン水溶液製剤。

7. 請求項1～3のいずれかに記載のHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤、請求項4記載のHGF安定化ゼラチン製剤、請求項5記載のHGFゼラチン複合体および請求項6記載のHGFゼラチン安定化水溶液製剤からなる群より選択されるいずれかの製剤からなる血管新生促進剤。

10 8. 請求項1～3のいずれかに記載のHGF徐放性ゼラチンヒドロゲル製剤、請求項4記載のHGF安定化ゼラチン製剤、請求項5記載のHGFゼラチン複合体および請求項6記載のHGFゼラチン安定化水溶液製剤からなる群より選択されるいずれかの製剤からなる動脈疾患治療剤。

図 1

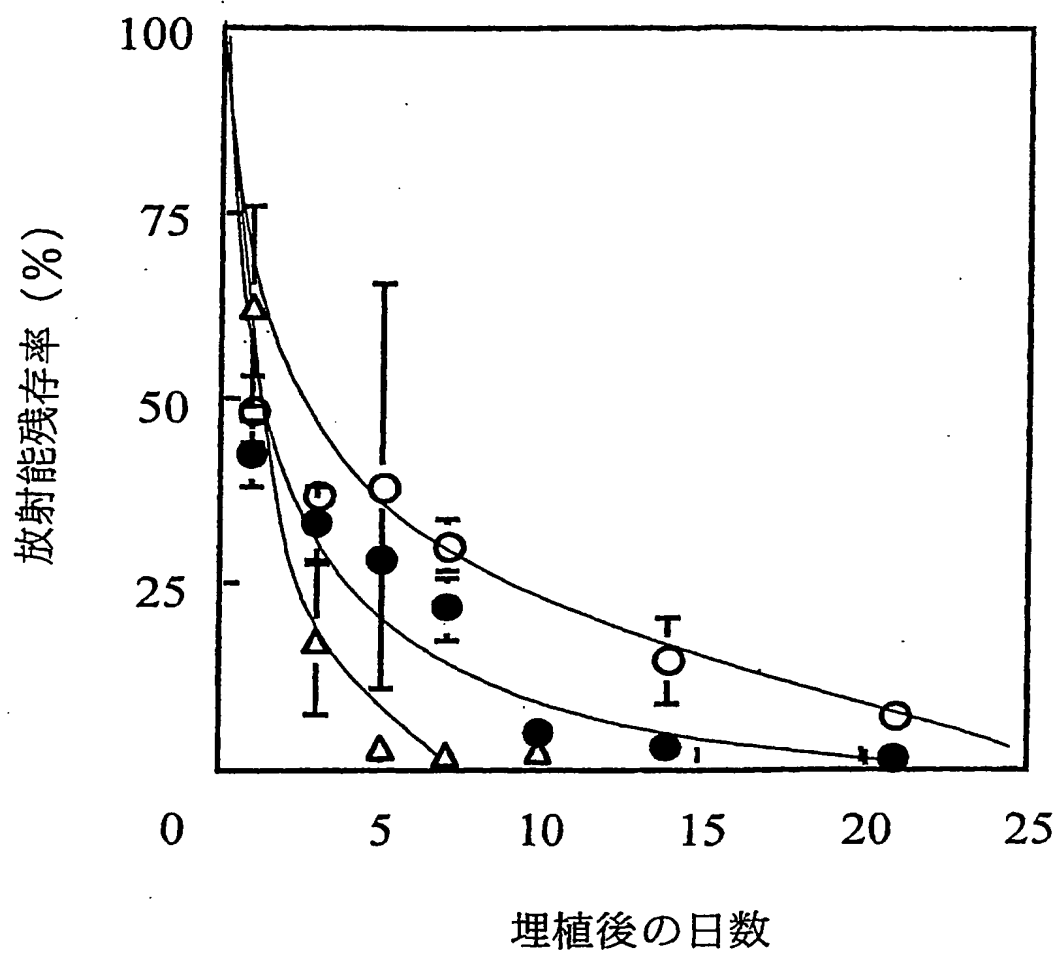


図 2

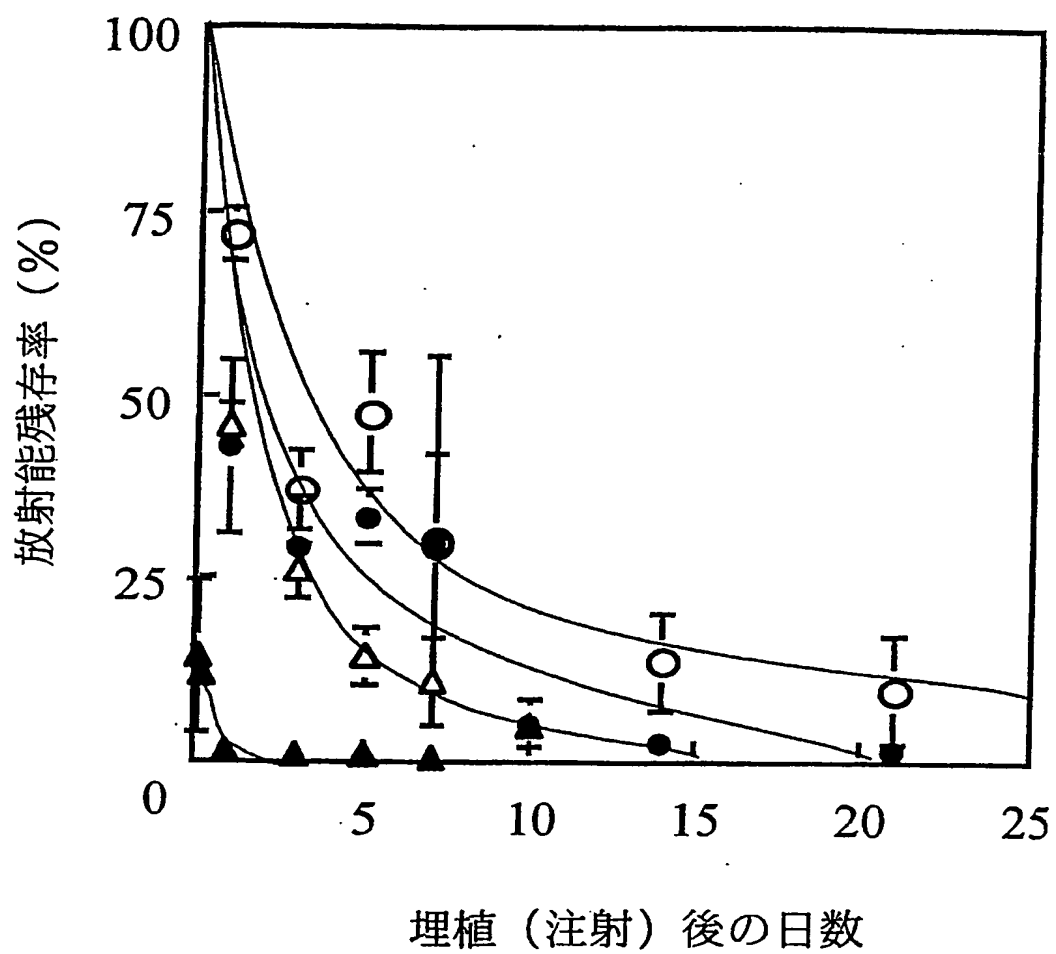


図 3

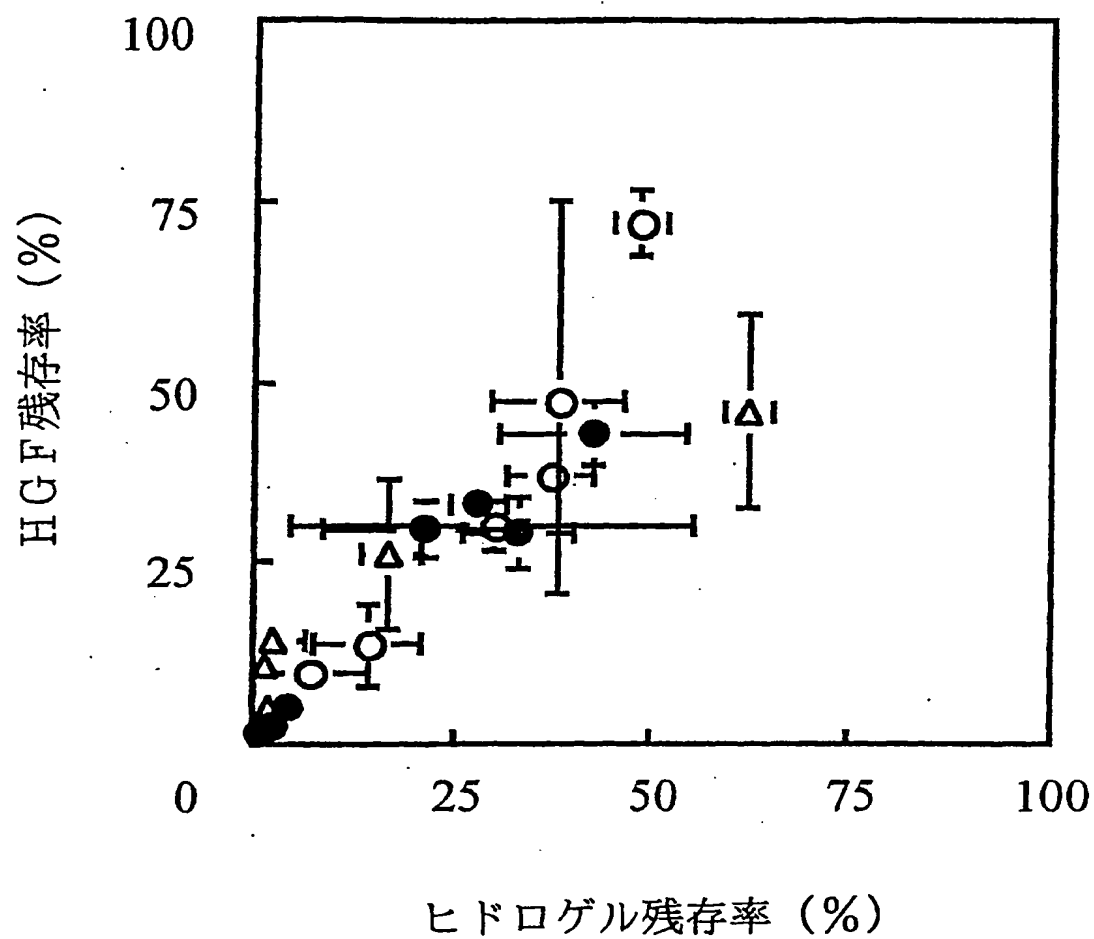


図 4

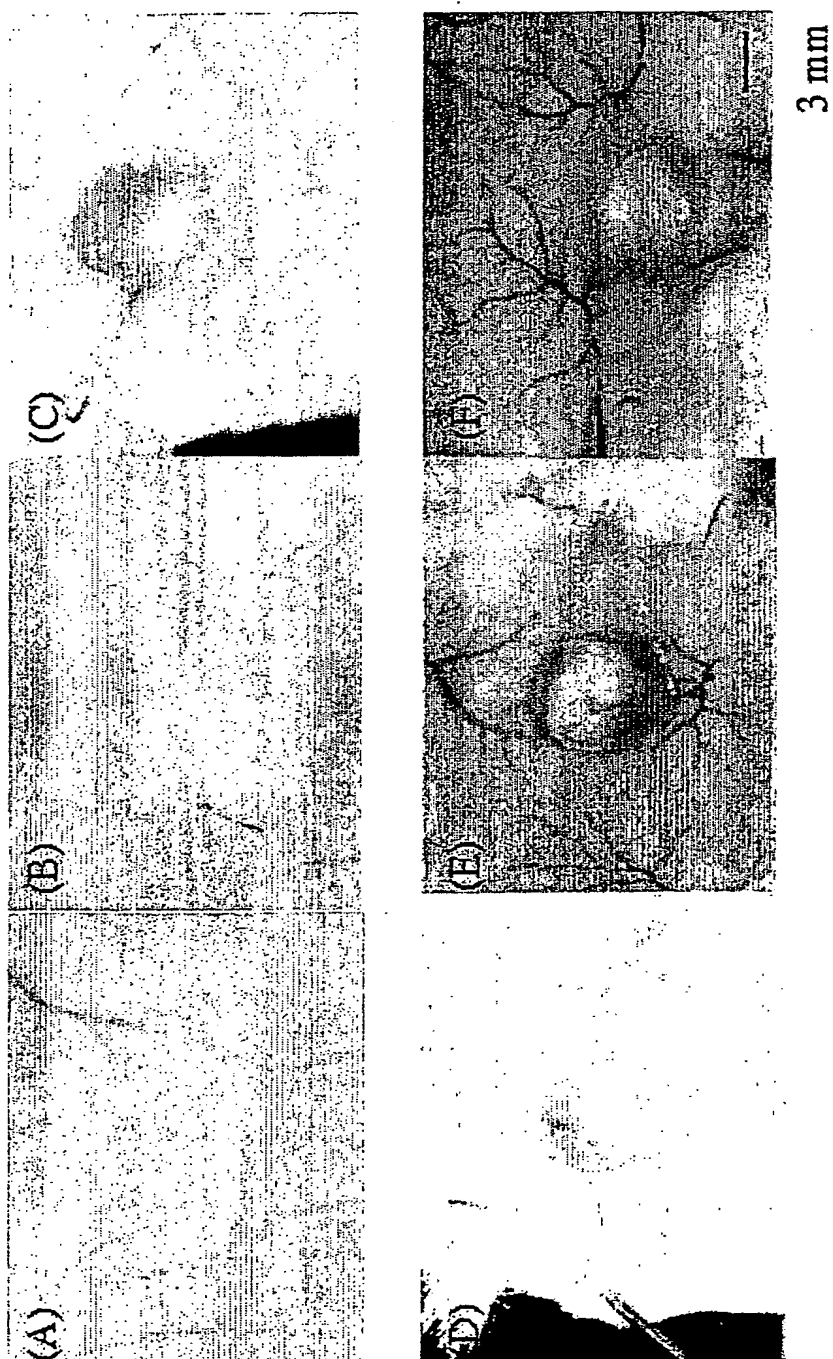


図 5

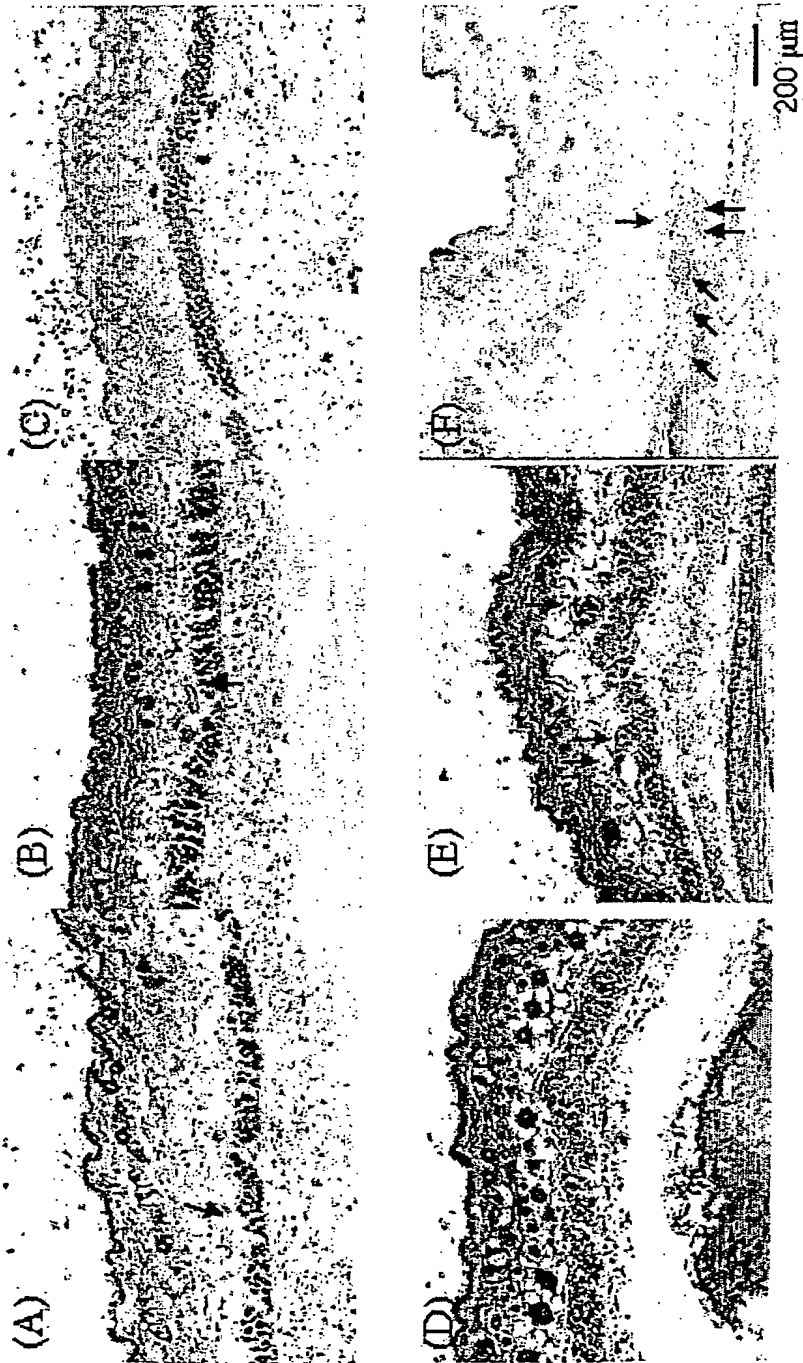


図 6

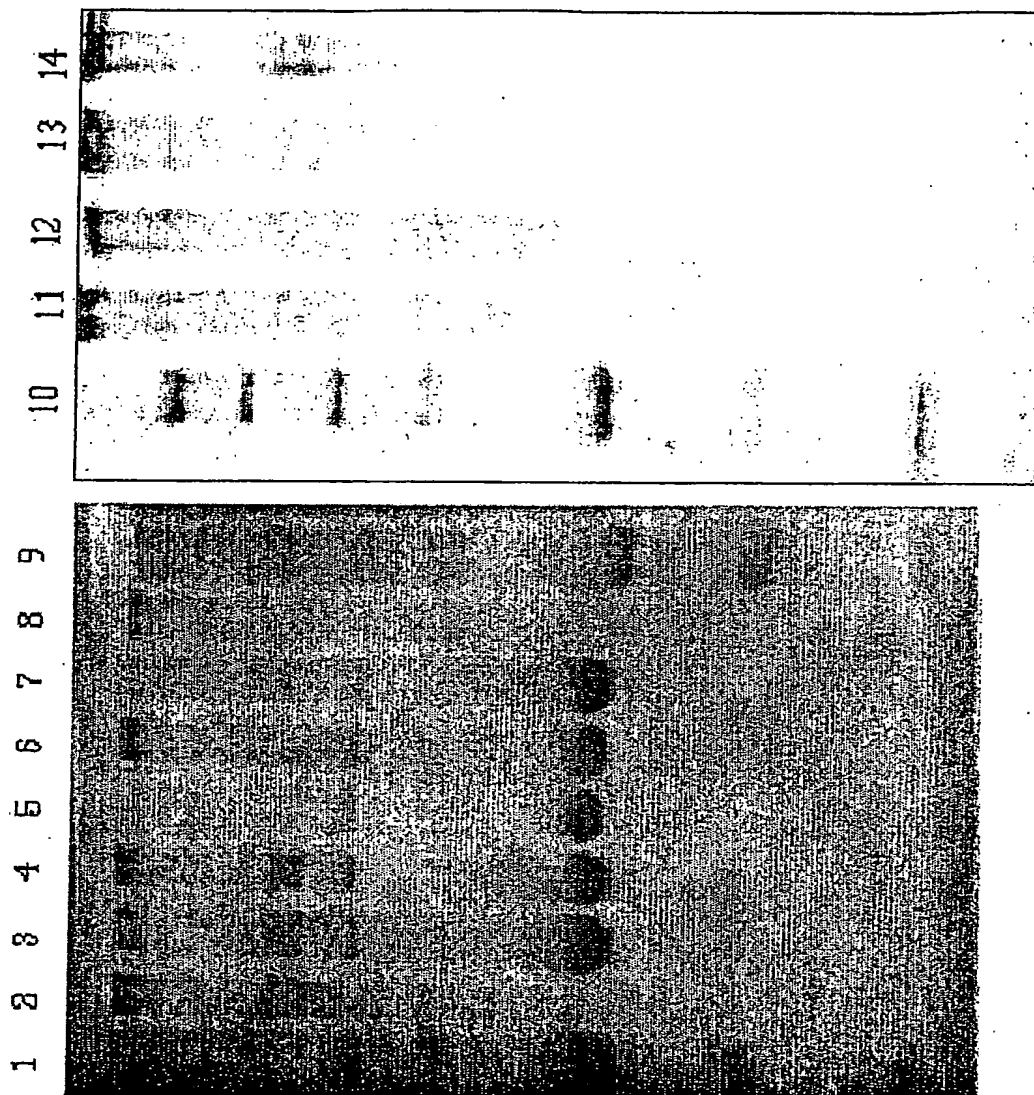


図 7 A

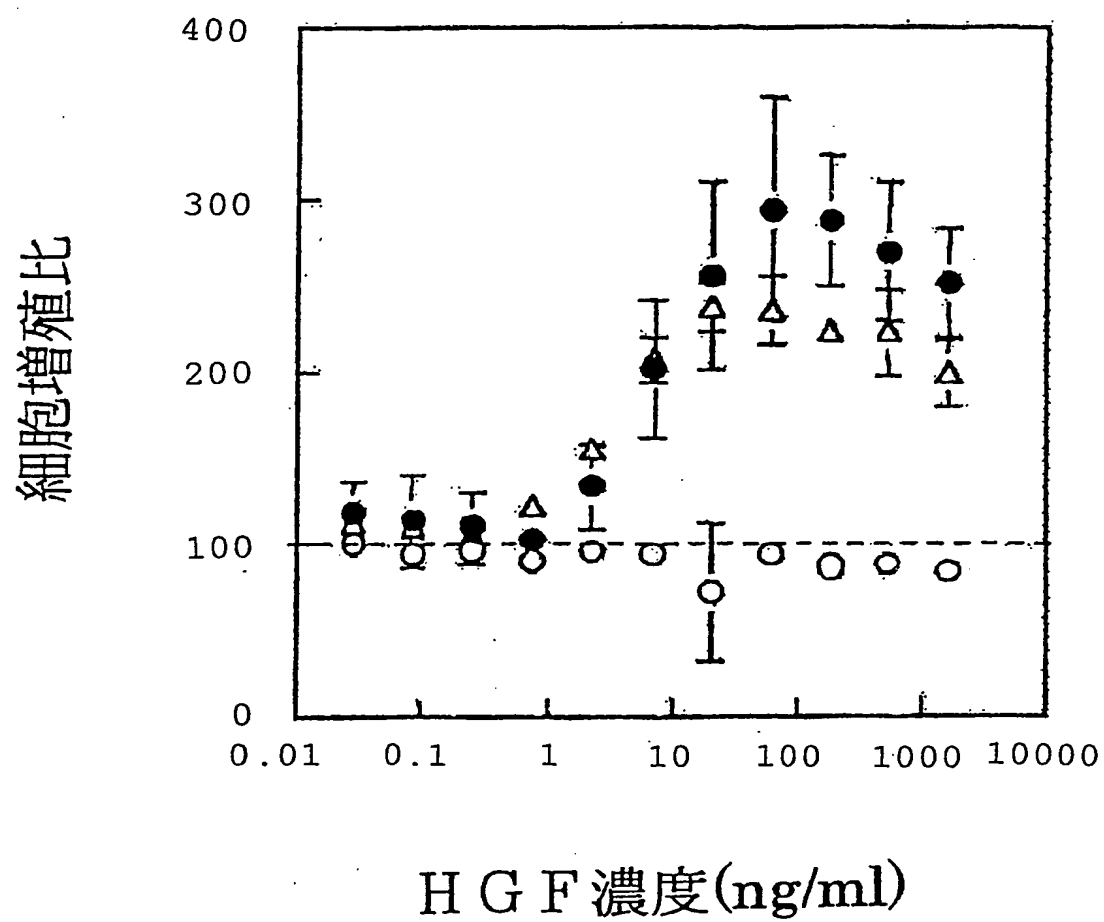
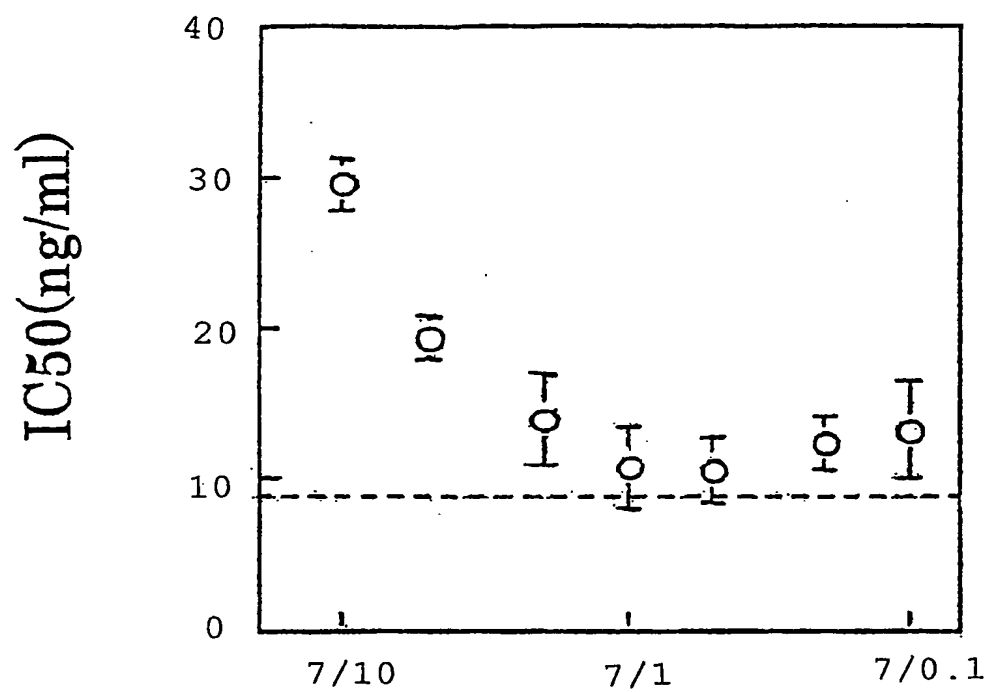
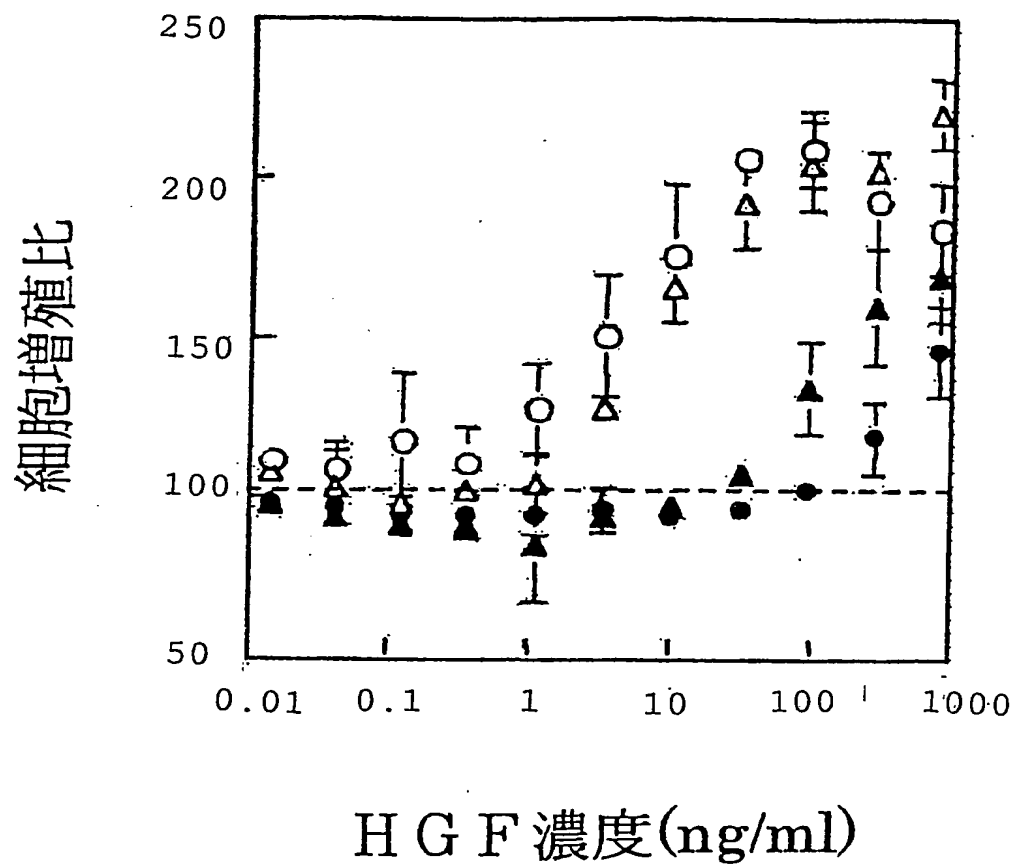


図 7 B



H G F /ゼラチン混合比 (モル/モル)

図 7 C



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07155

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/22, 9/06, 9/08, 47/42, 47/48, A61P9/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00-38/58

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), EMBASE(STN), WPI/L(QUESTEL), JOIS(JICST FILE)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 01/22989 A2 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), 05 April, 2001 (05.04.01), Page 9, lines 19 to 21; page 11, lines 11 to 16 & AU 200074495 A & EP 1218026 A2	1-7 8
Y	JP 08-295634 A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 12 November, 1996 (12.11.96), Claim 1 (Family: none)	8
A	YAMAMOTO, M. et al., Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel, J. Biomater. Soc. Polym. Ed., 2001 January, Vol.12, No.1, pages 77 to 88	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 September, 2002 (17.09.02)Date of mailing of the international search report
08 October, 2002 (08.10.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/22, 9/06, 9/08, 47/42, 47/48,
A61P9/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00-38/58

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2002年
日本国実用新案登録公報	1996-2002年
日本国登録実用新案公報	1994-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN),
EMBASE (STN), WPI/L (QUESTEL), JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 01/22989 A2 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2001.04.05 第9頁第19行～第21行、第11頁第11行～第16行参照 & AU 200074495 A & EP 1218026 A2	1-7 8
Y	JP 08-295634 A (住友製薬株式会社) 1996.11.12 請求項1参照 (ファミリーなし)	8
A	YAMAMOTO, M. et al, Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel, J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 2001 January, Vol.12, No.1, p.77-88	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.09.02

国際調査報告の発送日

08.10.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

岡崎 美穂



4C

3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452